UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

295

G. PICCI

La mineralizzazione del fosforo organico per via microbica

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME XV - (LI DALLA FONDAZIONE)
— 1952 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
25 FEB 1955

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

295

G. PICCI

La mineralizzazione del fosforo organico per via microbica

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME XV - (LI DALLA FONDAZIONE)
— 1952 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

G. PICCI

LA MINERALIZZAZIONE DEL FOSFORO ORGANICO PER VIA MICROBICA

RIASSUNTO - È stata ottenuta conferma che alcuni composti fosforati organici — e precisamente glicerofosfato e nucleinato sodico e lecitina — subiscono nel terreno una trasformazione microbica con trasformazione del fosforo organico in fosforo minerale. Tale trasformazione è condizionata dallo stato di fertilità del terreno e da altri fattori pedologici.

Sono stati altresì saggiati ceppi microbici in coltura pura, onde avere più precisa nozione degli effetti sortiti da ciascuna specie.

Dei composti organici studiati la lecitina si è dimostrata, almeno nella maggior parte dei casi, la meno attaccata.

RÉSUMÉ - L'A. a pu confirmer que certains composés organiques du phosphore — et plus précisément le glycérophosphate et nucléinate sodique et la lécithine — subissent dans le sol une transformation microbienne, par suite de laquelle le phosphore organique se transforme en phosphore minéral. Cette transformation se trouve en fonction des conditions de fertilité du terrain et d'autres facteurs pédologiques.

L'A. communique les résultats obtenus au cours d'expériences avec différentes souches microbiennes en culture pure, faites dans le but d'obtenir des données plus précises sur les effets attribuables a chacune des espèces de microbes séparément.

Parmi les composés organiques étudiés, la lécithine semble — au moins le plus souvent — être moins affectée par l'activité microbienne étudiée.

SUMMARY - It has been proved that some organic phosphoric compounds. — and more especially, the glycerophosphate, the sodium nucleate and the lecithin — undergo a microbian transformation in the soil, following which the organic phosphore is converted in mineral phosphore. This transformation depends on the fertility condition of the soil and on other pedological factors.

Experiments have also been carried out on some microbian strains in pure culture in order to obtain fuller, and more precise data on the effect due to each individual species of microbs.

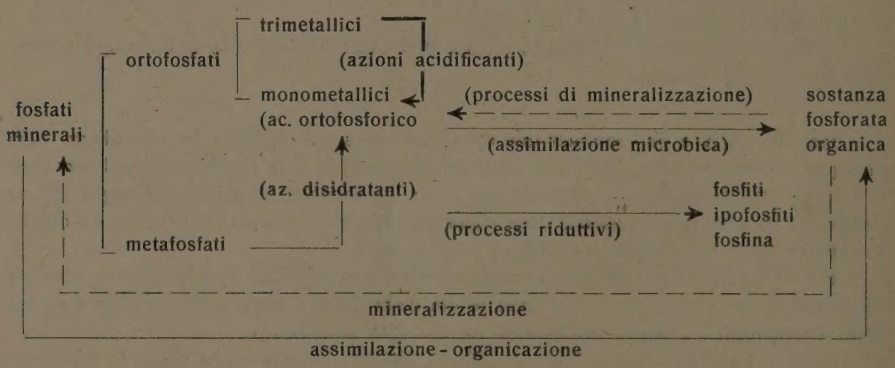
Among the organic compounds studied, lecithin — in the greater number of cases, at least —, seems to be less affected by the microbs.

ZUSAMMENFASSUNG - Es ist festgestellt worden, dass die organischen Phosphoverbindungen — und zwar besonders das Salz des Glycerinphosphorsäure (Glycerophosphat), das Natrium-Nucleat und das Lecithin — die sich im Boden befinden, einer mikrobischen Umbildung unterliegen, infolge welcher das organische Phosphor ins Mineralische übergeht. Dieser Uebergang hängt von den Fruchtbarkeitsverhältnissen des Bodens, sowie von anderen pädologischen Faktoren, ab.

Verschiedene Microbkenstämme wurden in Reinkulturen untersucht zwecks näherer Feststellung des Einflusses, den jeder einzelne Microbenstamm ausübt.

Zwischen den organischen Verbinfungen, die untersucht wurden, wird, fast in allen Fällen, das Lecithin weniger vom Microbenangriff in Mitleidenschaft gezogen.

Le conoscenze relative alla mobilizzazione microbica del fosforo nel terreno agrario ci consentono di fissare schematicamente, nel seguente diagramma, il ciclo evolutivo della P_2O_5 nel suolo:



A parte la trasformazione microbica dei metafosfati in acido ortofosforico — questione relativamente recente, ma che riveste notevole importanza là dove vengono impiegati come concimi fosfatici i metafosfati ([1]) — da tempo e in modo particolare sono stati studiati i processi di solubilizzazione dei fosfati

(1) - ROTINI O. T. - *Rapporti dei fertilizzanti con il terreno agrario e loro trasformazione* - Ann. Facoltà Agraria, Pisa, N. S., vol. XII, p. 159, 1951.
— — e CARLONI L. - *La trasformazione dei metafosfati in ortofosfati promossa dal terreno agrario* - Ann. Sper. Agraria, 1953.

insolubili (onde le forme trimetalliche passano a forme monometalliche) (1) come, da tempo, sono stati intravisti processi riduttivi (2).

Altre azioni microbiche studiate sono quelle che portano — per processi di assimilazione — alla formazione di sostanza fosforata organica, e quindi le opposte azioni che riportano la sostanza fosforata organica (e non solo quella di origine microbica, ma anche quella che altrimenti e in maniera prevalente perviene al terreno attraverso i resti vegetali e animali) allo stato minerale sotto forma di acido ortofosforico.

È di quest'ultimo processo che qui intendiamo occuparci.

STOKLASA (3) fu probabilmente il primo a dar cenno della possibile trasformazione microbica della sostanza fosforata organica in acido ortofosforico (4). A parte la constatata trasformazione in acido ortofosforico del fosfato di calcio contenuto nelle ossa come composto organico, in ulteriori esperienze valendosi di un mezzo costituito da acqua 1000 + solfato potassico 1 + cloruro di magnesio 0,5 + cloruro di sodio 0,125 + allume ferrico 0,015 + glu-

---

(1) - STOKLASA J., DUCHÀCÉK F. e PITRA J. - *Ueber den Einfluss der Bakterien auf die Knochenzersetzung* - Centr. f. Bakt., II Abt., vol. VI, p. 526, 1900.

KOCK A. e KROEBER E. - *Der Einfluss der Bodenbakterien auf das Löslichwerden der Phosphorsäure aus verschiedenen Phosphaten* - Fühling's Landw. Zeit. ; 7, 1906.

DE GRAZIA S. e CERZA U. - *Sull'intervento dei microrganismi nell'utilizzazione dei fosfati insolubili del suolo da parte delle piante superiori* - Staz. Sp. Agr., vol. 39, p. 1817, 1907.

SACHETTI G., PATTEN A. J. e BROWN C. W. - *The solvent action of soil bacteria upon the insolubre phosphates of raw bone meal and natural raw roch phosphate* - Centr. f. Bakt., II Abt., vol. XX, p. 688, 1908.

PEROTTI R. - *Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica nel terreno agrario* - Roma 1909.

(2) - RUDAKOW K. J. - *Die reduktion der mineralischen Phosphate auf biologischen Wege* - Centr. f. Bakt., II Abt., vol. LXX, p. 202, 1927 e vol. LXXXIX, p. 229, 1929.

(3) - STOKLASA J. - *Biochemischer Kreislauf des Phosphat-Jons im Boden* - Centr. f. Bakt., II Abt., vol. XXIX, p. 385, 1911.

(4) - Tale trasformazione, nel terreno agrario, non è soltanto di origine microbica. K. ASO, ad es., proponendosi di ricercare la causa dell'aumento di acido fosforico solubile nel terreno sottoposto all'addebbiatura, esaminando alcuni campioni di terreno debbiato o non, trovò:

Terreno naturale		$P_2O_5 = 0,145$
» »	arroventato al rosso	» = 0,327
» »	riscaldato per 3 h. in corrente vapore	» = 0,147
» »	autoclavato per 3 h. a 3 atm.	» = 0,351

Questi risultati sono stati confermati più recentemente da THOMPSON e BLACK. Sottoponendo tre diversi tipi di terreno a trattamento termico per temperature comprese tra — 14° e + 150° C. fu trovato che l'incremento in fosforo minerale solubile fu di appena 5 p.p.m. nei campioni tenuti a temperature inferiori ai + 30° quindi fu notevole per temperature superiori fino ad aversi completa mineralizzazione nei campioni sottoposti al riscaldamento di + 150° C.

[v. ASO K. - Ref. in Boll. Soc. Agr. Ital., n. 10, vol. XI, p. 394: *Sui composti organici di acido fosforico nel suolo* - Bull. Coll. Agr. Tokyo, Imp. Univ.

THOMPSON L. M. e BLACK C. A. - *The effect of temperature on the mineralisation of soil organic phosphorus* - Proc. Soil. Sci. Soc. Am., vol. XII, 1947].

cosio 10 + ac. nucleico 1 (1), STOKLASA trovò che *Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bac. proteus vulgaris* riuscivano a mineralizzare, rispettivamente, il 23,39, il 15,59 e il 18,93 % del fosforo presente nel mezzo. Notò STOKLASA che aggiungendo allo stesso mezzo una sostanza azotata il cui azoto fosse più facilmente utilizzabile che non l'azoto contenuto nell'acido nucleico il rendimento aumentava considerevolmente. In presenza di solfato ammonico le su riferite percentuali raggiunsero infatti i valori del 51,23 per *Bac. mycoides*, del 37,87 per *Bac. subtilis*, del 42,32 per *Bac. proteus*. In precedenti esperienze analoghi e anzi migliori risultati aveva ottenuto impiegando lecitina.

I ricordati reperti di STOKLASA si può dire siano rimasti pressochè isolati; solo in questi ultimi tempi, infatti, l'argomento è stato ripreso in esame specie per opera di THOMPSON (2) e di altri (3) in America e di MENKINA (4) in Russia. Non è a tacersi tuttavia come nel 1941 POLITI (5) da noi già si fosse occupato della mobilizzazione del fosforo legato ai complessi umico-minerali trovando come da tali complessi si liberino, per via microbica, quantità più o meno rilevanti di acido fosforico.

THOMPSON si è particolarmente occupato della mineralizzazione del fosforo organico in rapporto alla mineralizzazione dell'azoto e del carbonio in numerosi tipi di terreno incolto e coltivato, calcareo ed acido, constatando che i suoli incolti mineralizzano maggiori quantità di azoto, carbonio e fosforo che non i terreni coltivati e che altresì tale mineralizzazione è maggiore nei terreni calcarei che non nei terreni acidi. Una maggiore mineralizzazione nei suoli incolti fu quindi registrata da BOWER (6). Verò è che, il processo, legato,

---

(1) - Come unica sorgente di azoto e di fosforo. L'acido nucleico impiegato conteneva il 13,28 % di azoto e il 7,84 % di fosforo.

(2) - THOMPSON L. M., BLACK C. A. e CLAK F. E. - *Accumulation and mineralization of microbial organic phosphorus in soil materials* - Proc. Soil Sc. Soc. Amer., vol. 13, p. 242, 1949.

— — - *The mineralization of organic phosphorus, nitrogen and carbon in Clarion and Webster soils* - Proc. Soil Sci. Soc. Amer., vol. 14, p. 147, 1949.

— — - *The mineralization of organic phosphorus, nitrogen and carbon in Virgin and cultivated soils* - Jowa St. Coll. J. Sc., vol. 25, p. 369, 1951.

(3) - JACKMAN R. H. - *Mineralization of inositol-bound phosphorus in soil* - Jowa St. Coll. J. Sc., vol. 25, p. 260, 1951.

(4) - MENKINA R. A. - *Batteri che mineralizzano i composti organici di fosforo* - Microbiologia, vol. 19, p. 308, 1950 (rec. in: Boll. Inst. Pasteur, marzo 1951).

(5) - POLITI I. - *Sull' intervento microbico nei processi di mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario* - Ann. Microb., vol. 2, p. 23, 1941.

(6) - BOWER O. H. - *Studies on the forms and availability of soil organic phosphorus* - Jowa Ang. Expt. Sta. Res. Bull. 362, 1949.

come è noto, anche ad enzimi di origine non microbica, appare studiato, dai ricordati Autori, nel suo complesso e non nei suoi particolari aspetti microbiologici.

Molto maggiore interesse ha quindi per noi un lavoro, anch'esso recente, di MENKINA. Quest'ultimo Autore, partendo da colture di arricchimento ha isolato tre microrganismi sistematicamente diversi e cioè un batterio sporigeno mineralizzante l'acido nucleinico, ma inattivo sulla lecitina; un altro batterio sporigeno attivo sia sull'acido nucleinico che sulla lecitina e finalmente un batterio non sporigeno attivo sulla lecitina, ma solo debolmente sulle combinazioni nucleiniche.

Nel riprendere in esame l'argomento, dopo alcune esperienze introduttive intese a vedere la capacità mineralizzante di colture brute provenienti da vari terreni, abbiamo voluto in modo particolare saggiare l'attività mineralizzante di un certo numero di specie microbiche in coltura pura.

Come sorgente di fosforo organico abbiamo usato glicerofosfato sodico, nucleinato di sodio e lecitina apprezzando l'avvenuta mineralizzazione attraverso il dosaggio del fosforo precipitabile con molibdato ammonico.

1 - Una prima esperienza fu istituita al fine di vedere l'intensità del potere mineralizzante verso il fosforo di colture brute provenienti da terreni di diversa natura e diversamente ubicati e coltivati.

L'esperienza fu allestita usando come substrato quello stesso di STOKLASA con l'aggiunta, però, di nitrato ammonico dato che la contemporanea presenza di un sale azotato ammoniacale già risultò favorevole al ricordato Autore. Il mezzo alimentare usato aveva quindi la seguente composizione: acqua 1000, glucosio 10, nitrato di ammonio 2,5, solfato di potassio 1, cloruro di magnesio 0,5, cloruro di sodio 0,1, allume ferrico 0,015. Tale mezzo, una volta sterilizzato, fu addizionato dello 0,5 % di glicerofosfato sodico o altrimenti di nucleinato sodico oppure di lecitina a parte sterilizzati a secco al fine di evitare parziali decomposizioni dei composti fosforati quali si hanno a seguito della autoclavatura. Il glicerofosfato sodico, nucleinato sodico e lecitina impiegati

contenevano, rispettivamente, il 23,20, 20,42, 8,79 % di P_2O_5 pari al 9,97, 8,92, 3,84 % di P [1].

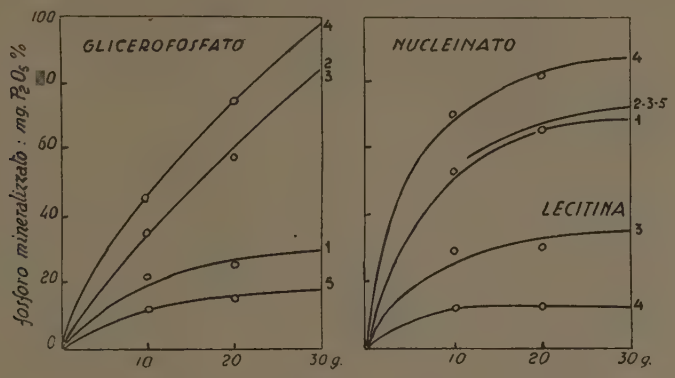
I matracci contenenti cc. 250 del ricordato mezzo furono seminati con cc. 0,5 di uno stemperamento di terra 10: acqua 100. In parallelo furono allestiti con le stesse modalità e con lo stesso materiale di semina altri matracci che furono, a controllo, tenuti inattivi per aggiunta di toluolo.

Fu incubato a 25-26° C. per 30 giorni dosando il fosforo allo stato minerale al 10°, 20° e 30° giorno.

Fu ottenuto:

Colture brute provenienti da	% di P_2O_5 presente nel mezzo mineralizzata											
	serie attiva									serie con toluolo (al 30° giorno)		
	Na-nucleinato			Na-glicerofosfato			Lecitina			nucleinato	glicerofosfato	lecitina
	10° g.	20° g.	30° g.	10° g.	20° g.	30° g.	10° g.	20° g.	30° g.			
1. Terreno argilloso di campo a grano (Pisa)	54,1	64,2	66,1	21,5	25,9	31,8	17,5	17,5	30,-	—	—	—
2. Terreno mediamente argilloso, ricco di umo da giardino (Pisa)	55,2	66,1	70,3	35,5	58,8	84,4	18,-	18,-	25,3	—	—	—
3. Terreno di medio impasto coltivato a grano (Pisa)	56,3	68,1	70,2	35,3	60,2	83,-	30,-	30,-	37,5	—	—	—
4. Terreno sabbioso umifero del litorale (Migliarino Pisano)	70,1	82,1	86,2	45,5	75,8	98,-	12,5	12,5	12,5	—	—	—
5. Terreno sabbioso non umifero del litorale (Tombolo)	55,4	68,1	70,2	12,3	17,-	19,1	18,-	18,-	19,-	—	—	—

(1) - Su 100 cc. di liquido colturale venivano quindi a trovarsi nella serie contenente glicerofosfato gr. 0,049 di P e gr. 0,120 di P_2O_5; nella serie con nucleinato gr. 0,046 di P e gr. 0,102 di P_2O_5; nella serie con lecitina gr. 0,019 di P e gr. 0,043 di P_2O_5.



Mineralizzazione del glicerofosfato sodico, del nucleinato sodico e della lecitina in colture brute di terreno (dai dati della precedente Tabella).

L'esperienza informa che i tre composti fosforati organici vengono mineralizzati dalla microflora terricola pur registrandosi differenze nei riguardi del grado e delle modalità di attacco. Scarsamente attaccata la lecitina, piú facilmente aggrediti furono il nucleinato e, sopratutto, il glicerofosfato di sodio. È ancora da rilevare il più pronto — anche se minore — attacco di nucleinato ciò forse in rapporto al suo contenuto in azoto.

Circa il comportamento dei diversi terreni saggiati si osserva che più di ogni altro attivo fu il terreno sabbioso-umifero cui seguì il terreno a medio impasto coltivato a grano e il terreno mediamente argilloso di giardino; di più debole attività risultarono il terreno tipicamente argilloso a grano e il terreno sabbioso assai magro di Tombolo, in ciò intravedendosi un certo rapporto con lo stato di fertilità biologica dei terreni stessi.

Giova ricordare che qualche prova marginale che meglio approfondiremo in seguito ha lasciato intravedere una certa influenza della composizione del mezzo con riferimento alla sorgente azotata, carboniata e al pH. Tra l'altro si è rilevato, ad es., come anche in mezzi azoto-carenti, ma non acidi, inoculati con cc. 0,5 di terra 10: acqua 100, si abbia mineralizzazione di fosforo, ciò dovuto nei substrati contenenti glicerofosfato sodico o lecitina a sviluppo di microrganismi oligonitrofili, non escluso azotobatteri.

2 - Ma, in proseguimento, premeva sopratutto di seguire l'attività di specie in coltura pura con questo riallacciandosi ai primi reperti di STOKLASA che, come si è ricordato, sperimentò con *Bac. mycoides, Bac. subtilis e Bac. proteus vulgaris.*

Furono saggiati alcuni batteri sporigeni, alcuni lieviti e alcuni funghi a micelio usando per ogni gruppo di microrganismi adatti mezzi alimentari. Precisamente: per i batteri il liquido di STOKLASA (acqua 1000, glucosio 10, nitrato ammonico 2,5, solfato bipotassico 1, cloruro di magnesio 0,5, cloruro di sodio 0,1, allume ferrico 0,015); per i lieviti adatto liquido sintetico (acqua 1000, glucosio 100, solfato ammonico 5, solfato di magnesio 0,1, acido tartarico 1); per i funghi il liquido di Czapek-Dox privo, naturalmente, di fosforo. In tutti Na-nucleinato o Na-glicerofosfato o lecitina nelle quantità dello 0,5 %. Dosando il fosforo mineralizzato al 10° e al 20° giorno si ottennero i risultati seguenti:

Mineralizzazione del fosforo del nucleinato e del glicerofosfato di sodio per opera di alcuni batteri sporigeni (% di P_2O_5 presente nel mezzo) (1).

	Na-nucleinato dopo		Na-glicerofosfato dopo	
	10° g.	20° g.	10° g.	20° g.
Controllo	—	—	—	—
Bac. subtilis	18,-	18,2	1,7	4,8
Bac. vulgatus	24,1	26,1	1,7	1,7
Bac. mesentericus	32,2	35,2	2,1	2,4
Bac. megatherium	14,1	16,3	2,8	3,-
Bac. petasites	18,1	20,2	3,4	3,9
Bac. asterosporus	26,2	30,1	2,8	3,4
Bac. fusiformis	22,2	25,1	1,7	1,7
Bac. robur	16,-	18,1	2,4	4,8
Bac. malabarensis	18,-	20,1	1,8	2,4

(1) - Fu sperimentata anche la lecitina, ma di essa non si ebbe mineralizzazione apprezzabile.

Mineralizzazione del fosforo del nucleinato e del glicerofosfato di sodio per opera di alcuni lieviti (% di P_2O_5 presente nel mezzo).

	Na-nucleinato dopo		Na-glicerofosfato dopo	
	10° g.	20° g.	10° g.	20° g.
Controllo	—	—	—	—
Sacch. ellipsoideus (1)	5,1	10,1	4,3	32,7
» » (2)	5,3	10,4	7,-	32,5
» » (3)	5,2	9,-	10,3	55,1
Hansenula anomala	2,-	2,8	tr.	14,6
Debaryomyces tyrocola	3,2	4,1	tr.	7,-
» *Guilliermondi*	tr.	tr.	tr.	1,7
Rhodotorula mucilaginosa	2,-	3,-	tr.	1,7
Candida albicans	4,-	14,-	2,4	7,2
» *tropicalis*	5,1	14,1	7,-	17,-
» *pulcherrima*	4,-	20,-	3,4	17,-

Mineralizzazione del fosforo del Na-nucleinato, Na--glicerofosfato e della lecitina per opera di alcuni funghi a micelio al 20° giorno di coltura (P_2O_5 % di quella presente nel mezzo).

	Na-nucleinato	Na-glicerofosfato	Lecitina
Controllo	—	—	—
Aspergillus glaucus	3,1	13,7	—
» *niger*	—	4,2	—
Penicillium chrisogenum	—	13,7	7,5
» *citrinum*	3,2	22,3	10,-
» sp.	—	12,-	7,-
» *notatum*	5,2	17,2	—
Alternaria solani	4,3	34,4	—
Sphaeropsis dalmatica	3,1	17,2	—
Trichothecium roseum	3,1	12,8	—

Il comportamento delle singole specie saggiate appare quindi diverso. Più attivo di ogni altro gruppo quello degli Schizomiceti; a questo seguono i lieviti, con azione diversa da specie a specie, e, finalmente, i funghi qualche specie dei quali riesce ad attaccare la lecitina non mineralizzata dagli altri gruppi microbici.

CONCLUSIONI

Le riferite ricerche confermano che alcune combinazioni organiche del fosforo — glicerofosfato e nucleinato sodico e lecitina — vanno incontro, nel terreno, a decomposizione microbica con trasformazione del fosforo organico in fosforo minerale. L'intensità di tale trasformazione varia da terreno a terreno in funzione forse dello stato di fertilità biologica dei singoli terreni. Tale processo di mineralizzazione si intravede inoltre condizionato ad altri fattori pedologici in quanto essi si dimostrino incidere sullo sviluppo microbico.

Dei composti saggiati i più facilmente aggredibili si sono dimostrati il nucleinato e il glicerofosfato di sodio e il più resistente la lecitina.

Saggiate colture microbiche in coltura pura si è notato che esse manifestano azione mineralizzante in misura diversa secondo il loro grado di organizzazione e secondo anche i singoli composti. Gli schizomiceti sporigeni si dimostrano così assai attivi verso il Na-nucleinato, meno verso il Na-glicerofosfato, non attivi verso la lecitina. I lieviti sembrano meno attivi degli schizomiceti presentando differenze notevoli da specie a specie; tra quelle sperimentate la specie più attiva, massime verso il Na-glicerofosfato, è stato *Sacch. ellipsoideus;* come gli schizomiceti essi non attaccano la lecitina. I funghi, finalmente, si dimostrano più che altro attivi verso il Na-glicerofosfato e molto scarsamente attivi verso il nucleinato. Peraltro qualche specie ha dimostrato di attaccare anche la lecitina.